

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21720061152246

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

硕士学位论文

裂殖酵母中核仁蛋白 Dnt1 与肿瘤抑制因子  
Chfr 的同源蛋白 Dma1 相互作用的研究

Study on the interaction between nucleolar protein Dnt1 and  
tumor suppressor Chfr's homologue Dma1 in fission yeast

孙学丽

指导教师姓名: 靳全文

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 4 月

论文答辩时间: 2009 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评阅人: \_\_\_\_\_

2009 年 5 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（     ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（     ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

## 摘要

在裂殖酵母 *S. pombe* 中，人类肿瘤抑制因子 Chfr 的同源蛋白 Dma1 是纺锤体检验点蛋白和胞质分裂的抑制因子，它通过抑制 SIN(septation initiation network) 信号途径来阻止胞质分裂的起始；在有丝分裂后期 Dma1 同时定位在纺锤体极体（spindle pole body，简称 SPB；相当于哺乳动物的中心体）和有丝分裂环上。而核仁蛋白 Dnt1 与芽殖酵母中的 Net1/Cfi1 具有同源序列，是一个新发现的有丝分裂早期 SIN 的抑制因子；整个细胞周期 Dnt1 都在核仁内有定位，在有丝分裂后期还会定位在纺锤体及 SPB 上。基于 Dma1 和 Dnt1 都有在 SPB 上定位，并且均可调控胞质分裂过程，因此本论文主要研究 Dma1 和 Dnt1 两种蛋白的相互作用关系。

我们将 Dma1 和 Dnt1 分别在细菌和 *dnt1*Δ 的酵母细胞中表达后，进行 pull-down 实验，纯化后的结果显示 Dma1 与 Dnt1 在体外有着直接的相互作用；随后我们在细菌内表达 Dma1 的全长和 FHA 区域缺失突变体，让其分别与酵母细胞内表达的 Dnt1-13myc 进行体外结合实验，Western blot 检测结果发现两种蛋白之间的相互作用是通过 Dma1 的 FHA 区域介导的，而 FHA 区域，被认为是一个可以识别并结合到被磷酸化的肽链或蛋白上的区域。本论文中分别用 CIAP 和 λ-PPase 对蛋白进行去磷酸化处理，结果发现 Dnt1 蛋白磷酸化后才可以与 Dma1 相结合。

因为 Dma1 与磷酸化 Dnt1 在有丝分裂中期的相互作用可以达到最强，而 CDK1 和 Plo1 是调节酵母细胞周期中的两个关键激酶，其活性都是在有丝分裂中期达到最高；我们分别利用 CDK1 位点突变的 *dnt1(7A)*、*dnt1(11A)* 和 Plo1 突变体 *plo1-24c*、*plo1-25* 以及与 Plo 激酶活性有关的突变体 *cut12.1* 检测这两种激酶对 Dnt1 磷酸化的影响，结果显示 CDK1 和 Plo1 可能并不影响 Dnt1 的磷酸化进而影响 Dnt1 与 Dma1 的相互作用。

本论文初步阐明了 Dma1 与 Dnt1 蛋白的相互作用机制，在正常的有丝分裂中期被磷酸化后的 Dnt1 可以很强地结合到 Dma1 上，以达到在这一时期抑制 Dma1

的 E3 泛素连接酶活性的目的, 保护 Dma1 的底物不会在这一时期过早被降解。鉴于裂殖酵母中的 Dma1 是哺乳动物中 Chfr 的同源蛋白, 对于 Dma1 的深入研究将加深我们对于 Chfr 的功能的认识。

关键词: Dma1; Dnt1; SIN 信号途径;

## Abstract

In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, the tumor suppressor Chfr's homologue Dma1 which is a spindle checkpoint protein and cytokinesis inhibitor, prevents cytokinesis by inhibiting the SIN. In the anaphase, Dma1-GFP signal was observed at both the division site and SPB. As a new inhibitor of SIN in early mitosis, nucleolar protein Dnt1 is localized in the nucleolus throughout the cell cycle, at anaphase it localizes to the SPB. Dnt1 shows sequence homology to Net1/Cfi1 in budding yeast. Based on the facts that both Dma1 and Dnt1 localize at SPB and involve in regulation of cytokinesis, we set out to examine the interaction between Dma1 and Dnt1 in fission yeast.

We performed in vitro affinity assay using bacterially expressed recombinant protein MBP-Dma1 to incubate with cell extract from *dnt1* $\Delta$  cells carrying genomically integrated Dnt1-12myc. The result showed that Dnt1 can efficiently bind to Dma1, suggesting physical interaction between Dma1 and Dnt1 in vitro. We expressed the MBP-tagged Dma1 full-length and *dma1* $\Delta^{FHA}$  in *E.coli* and performed pull-down assay with Dnt1-13myc expressed in fission yeast. Western blot suggested FHA domain was required for the interaction between Dma1 and Dnt1, And Dma1's FHA domain has been considered as a phosphopeptide binding domain. When protein was dephosphorylated with calf-intestinal alkaline phosphatase(CIAP) or  $\lambda$ -Protein phosphatase( $\lambda$ -PPase), Our results strongly suggest that the phosphorylated form of Dnt1 binds Dma1.

Because the phosphorylated form of Dnt1 binds Dma1 and the binding between these two proteins become the strongest at mitotic metaphase, we were suspicious that two major kinases, CDK1 and Plo1, might be responsible for phosphorylating Dnt1 when they have highest activity at metaphase. However, when we used the CDK1 sites mutants *dnt1*(7A) and *dnt1*(11A), metaphase-arrested *plo1-24C* and *plo1-25* cells, and *cut12.1* mutants which have compromised Plo1 activity respectively to test

whether CDK1 and Pl $\alpha$ 1 have function in the interaction between Dma1 and Dnt1, we found that the interaction between these two proteins stayed intact. This suggests that there are must be other kinases which is involved in phosphorylating Dnt1 and enhance its binding capacity to Dma1.

In this study, we have attacked the question that how Dma1 interacts with Dnt1 and how the interaction is regulated. We found that the phosphorylated form of Dnt1 binds strongly to Dma1 at metaphase through Dma1's FHA domain. Since Dma1 is the mammalian protein Chfr's homolog, our study on Dma1's regulation will certainly further our understanding of Chfr's function.

Key word: Dma1; Dnt1; SIN pathway;

## 缩写词表

MS	mass spectrometry 质谱
APS	ammonium persulfate 过硫酸铵
BSA	bovine albumin serum 牛血清白蛋白
TAP	tandem affinity purification 亲和串联层析
MEN	mitotic exit network 芽殖酵母中有丝分裂完成信号途径
SIN	septation initiation network 裂殖酵母中隔膜起始信号途径
SPB	spindle pole body 纺锤体极体
GAP	GTPase-activating protein GTP 激活蛋白
CDK	cyclin-dependent kinases 周期蛋白依赖性蛋白激酶
MPF	maturation promoting factor 成熟促进因子
GFP	Green Fluorescent Protein 绿色荧光蛋白
MBP	Maltose Binding Protein 麦芽糖结合蛋白
Co-IP	Co immunoprecipitation 免疫共沉淀
CIAP	Calf-intestinal alkaline phosphatase 牛小肠碱性磷酸酶
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole 4',6-二脒基-2-苯基吲哚
DMSO	dimethyl sulfoxide 二甲亚砜
DNA	deoxyribonucleic acid 脱氧核糖核酸
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate 脱氧核苷三磷酸
DTT	dithiothreitol 二硫苏糖醇
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> 大肠杆菌
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid 乙二胺四乙酸
IPTG	isopropylthio-D-galactoside 异丙基--D-半乳糖苷
OD	optical density 光密度
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis 聚丙烯酰胺凝胶电泳
PCR	polymerase chain reaction 聚合酶链式反应
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride 苯甲基磺酰氟



LB	Luria Borth medium 肉汤培养基
SDS	sodium dodecyl sulfate 十二烷基磺酸钠
TE Tris/EDTA	Tris/EDTA 缓冲盐溶液
TEMED	N N N' N'-tetramethylethylenediamine N N N' N'-四甲基二乙胺
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane 三羟基甲基氨基甲烷

## 目录

中文摘要	I
英文摘要	III
缩写词表	V
1 前言	1
1.1 裂殖酵母中调控细胞胞质分裂的信号途径 SIN	1
1.1.1 SIN 的蛋白组份及其功能	1
1.1.2 SIN 信号通路的保守性	3
1.2 细胞核分裂与细胞胞质分裂的准确协调及 Dma1 在这一过程中的功能	4
1.2.1 Dma1 与人类肿瘤抑制因子 Chfr 具有序列同源性	4
1.2.2 Dma1 通过抑制 SIN 信号途径阻止胞质分裂的起始	5
1.3 Dnt1 是一个新发现的有丝分裂早期的抑制因子	6
1.4 CDK1 对有丝分裂的调控	7
1.5 Plo1 在有丝分裂中的调控作用	8
1.5.1 <i>plo1-24C</i> 和 <i>plo1-25</i> 突变体的早期呈现染色体过度集缩的表型	8
1.5.2 <i>cut12.1</i> 对 Plo1 激酶活性的调控	9
1.6 本论文研究的内容、目的和意义	9
2 材料与方法	11
2.1 材料	11
2.1.1 大肠杆菌菌株	11
2.1.2 酵母菌株	11
2.1.3 质粒	12
2.1.4 引物	13
2.1.5 分子生物学工具酶	14
2.1.6 主要试剂与耗材	14
2.1.7 主要仪器与设备	15

2.1.8 常用培养基和缓冲液 .....	16
<b>2.2 方法 .....</b>	<b>22</b>
2.2.1 酵母杂交 .....	22
2.2.2 带有标签的 Dnt1-12myc 表达载体的构建 .....	23
2.2.3 细菌和酵母转化 .....	25
2.2.4 目的蛋白在酵母或细菌体内的诱导表达 .....	26
2.2.5 目的蛋白的检测 .....	27
2.2.6 免疫印迹检测 .....	27
2.2.7 蛋白体外结合 .....	27
2.2.8 免疫共沉淀 .....	28
2.2.9 定点突变的构建 .....	28
2.2.10 Dnt1 蛋白去磷酸化处理 .....	31
2.2.11 蛋白纯化后的去磷酸化处理 .....	32
<b>3 结果与分析 .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 带有标签的蛋白 Dnt1-12myc 在酵母中的表达 .....</b>	<b>34</b>
3.1.1 基因 <i>dnt1</i> 的扩增 .....	34
3.1.2 融和表达载体 pNCH472-dnt1 的构建 .....	34
3.1.3 融和表达质粒 pNCH472-dnt1 的筛选 .....	35
3.1.4 质粒 pNCH1472-dnt1 的酵母转化 .....	36
3.1.5 Dnt1-12myc 融合蛋白的诱导表达 .....	37
3.1.6 Dnt1-12myc 融合蛋白表达的检测 .....	37
<b>3.2 融合蛋白 MBP-Dma1 在细菌中的表达检测 .....</b>	<b>38</b>
3.2.1 MBP-dam1 表达质粒的转化 .....	38
3.2.2 MBP-Dma1 的细菌内诱导表达 .....	38
3.2.3 MBP-Dma1 蛋白的检测 .....	38
<b>3.3 细菌内表达的 MBP-Dma1 与酵母表达的 Dnt1-12myc 的相互作用 .....</b>	<b>39</b>
3.3.1 体外 pull-down .....	39
3.3.2 Dma1 与 Dnt1 的体外结合依赖 FHA 结构域 .....	39
<b>3.4 Dma1 蛋白与磷酸化的 Dnt1 蛋白的相互作用 .....</b>	<b>40</b>

3.4.1 与 Dma1 相互作用的 Dnt1 为磷酸化蛋白 .....	40
3.4.2 $\lambda$ -PPase 处理可以减弱或去除已经与 Dma1 结合的 Dnt1 .....	42
3.4.3 $\lambda$ -PPase 处理表达 Dnt1-13myc 的酵母裂解液可以减弱 Dma1 与其结合的强度 .....	43
<b>3.5 CDK1 激酶对 Dnt1 与 Dma1 相互作用的潜在影响 .....</b>	<b>45</b>
3.5.1 7 个 CDK1 磷酸化位点突变了 <i>dnt1</i> 酵母表达质粒的构建 .....	45
3.5.2 质粒 pNCH1472-Dnt1(7A)的酵母转化和 Dnt1(7A)-12myc 蛋白的诱导表达 .....	45
3.5.3 MBP pull-down .....	45
3.5.4 Dma1 与 Dnt1(7A)的体外相互作用的检测 .....	45
3.5.5 突变质粒 pNCH1472-Dnt1(11A)的构建 .....	46
3.5.6 质粒 pNCH1472-dnt1(11A)的酵母转化 Dnt1(11A)-12myc 蛋白的诱导表达 .....	47
3.5.7 MBP pull-down .....	47
3.5.8 Dma1 与 Dnt1(11A)的体外结合的检测 .....	47
<b>3.6 Plo1 激酶对 Dma1 与 Dnt1 结合的影响 .....</b>	<b>48</b>
3.6.1 <i>plol-24C</i> 和 <i>plol-25</i> 激酶突变体对 Dma1 与 Dnt1 相互作用的影响 .....	49
3.6.2 <i>cut12.1</i> 突变体对 Dma1 与 Dnt1 相互作用的影响 .....	53
<b>4 结论与讨论 .....</b>	<b>55</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>59</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>66</b>

## Contents

<b>Chinese abstract</b>	I
<b>English abstract</b>	III
<b>Abbreviations</b>	V
<b>1 Introduction</b>	1
<b>1.1 The SIN pathway regulating cytokinesis in fission yeast</b>	1
1.1.1 SIN components and their functions	1
1.1.2 The conservation of SIN pathway	3
<b>1.2 Dma1's function in the tightly coordinated between mitosis and cytokinesis</b>	4
1.2.1 Dnt1 shows sequence homology to human tumor suppressor Chfr	4
1.1.2 Dma1 prevents cytokinesis by inhibiting the SIN	5
<b>1.3 Dnt1 as a novel inhibitor in early mitosis</b>	6
<b>1.4 CDK1's function in regulation of mitosis</b>	7
<b>1.5 Plo1's function in regulation of mitosis</b>	8
1.5.1 <i>plo1-24C</i> and <i>plo1-25</i> mutants show chromosome condensation phenotype at early mitosis	8
1.5.2 The regulation of cut12.1 in Plo1 kinase activity	9
<b>1.6 Contents, purpose and significance</b>	9
<b>2 Materials and methods</b>	11
<b>2.1 Materials</b>	11
2.1.1 Bacterium strains	11
2.1.2 Yeast strains	11
2.1.3 Plasmid	12
2.1.4 Prime	13
2.1.5 Molecular tool enzyme	14
2.1.6 Regents	14
2.1.7 Main instruments	15

2.1.8 Primary solutions and buffer .....	16
<b>2.2 Methods</b> .....	22
2.2.1 Crossing .....	22
2.2.2 Construction of expression vector Dnt1-12myc .....	23
2.2.3 Transformation in <i>E.coli</i> and fission yeast .....	25
2.2.4 Expression of proteins in <i>E.coli</i> and fission yeast .....	26
2.2.5 Calculation of proteins' concentration .....	27
2.2.6 Western bolt .....	28
2.2.7 Pull-down .....	28
2.2.8 Co-immunoprecipitation (Co-IP) .....	28
2.2.9 Site-directed mutagenesis .....	28
2.2.10 Dephosphorylation of Dnt1 .....	31
2.2.11 Dephosphorylation of purified protein .....	32
<b>3 Results and analysis</b> .....	34
<b>3.1 Expression of Dnt1-12myc in fission yeast</b> .....	34
3.1.1 Amplification of <i>dnt1</i> .....	34
3.1.2 Construction of pNCH472-dnt1 .....	34
3.1.3 Screening of pNCH472-dnt1 .....	35
3.1.4 Transformation of pNCH1472-dnt1 in fission yeast .....	36
3.1.5 Induced expression of Dnt1-12myc .....	37
3.1.6 Detection of expression for Dnt1-12myc .....	37
<b>3.2 Analysis of expression for MBP-Dma1 in bacteria</b> .....	38
3.2.1 Transformation of MBP-dam1 .....	38
3.2.2 Induced expression of MBP-Dma1 .....	38
3.2.3 Detection of expression for MBP-Dma1 .....	38
<b>3.3 Interaction between MBP-Dma1 expressed in bacteria and Dnt1-12myc expressed in fission yeast</b> .....	39
3.3.1 MBP pull-down .....	39
3.3.2 Dnt1 bound to Dma1 depending on FHA domain <i>in vitro</i> .....	39

<b>3.4 Dma1 binds to phosphorylated Dnt1</b>	40
3.4.1 Dnt1 binding to Dma1 is phosphorylated protein	40
3.4.2 $\lambda$ -PPase reduces or removes Dnt1 bounding to Dma1	42
3.4.3 The interaction was significantly reduced when yeast cell extracts were treated with $\lambda$ -PPase before immunoprecipitation	43
<b>3.5 CDK1's potential affection in the interaction between Dma1 and Dnt1</b>	45
3.5.1 Construction of <i>dnt1</i> with 7 CDK1 sites mutated	45
3.5.2 Transformation of pNCH1472-Dnt1(7A) in fission yeast and expression of Dnt1(7A)-12myc	45
3.5.3 MBP pull-down	45
3.5.4 Detection of interaction between Dma1 and Dnt1(7A) <i>in vitro</i>	45
3.5.5 Construction of pNCH1472-Dnt1(11A)	46
3.5.6 Transformation of pNCH1472-Dnt1(11A) in fission yeast and expression of Dnt1(11A)-12myc	47
3.5.7 MBP pull-down	47
3.5.8 Detection of interaction between Dma1 and Dnt1(11A)-12myc <i>in vitro</i>	47
<b>3.5 Plo1's function in the interaction between Dma1 and Dnt1</b>	48
3.6.1 The function of <i>plo1-24C</i> and <i>plo1-25</i> mutants in the interaction between Dma1 and Dnt1	49
3.6.2 The function of <i>cut12.1</i> mutants in the interaction between Dma1 and Dnt1	53
<b>4 Conclusion and discussion</b>	55
<b>References</b>	59
<b>Acknowledgments</b>	66

## 1 前言

裂殖酵母 (Fission Yeast, *Schizosaccharomyces pombe*) 是一种单细胞真核生物, 以均等分裂的方式产生子代细胞。在进化上与芽殖酵母 (budding yeast, *Saccharomyces cerevisia*) 亲缘关系较远<sup>[1]</sup>。得益于其独特的优点, 如易培养, 细胞周期短, 易分离突变体, 易进行遗传学、生物化学及分子生物学的操作等, 长期以来, 裂殖酵母被广泛用作细胞周期研究的模式材料。裂殖酵母领袖人物 Paul Nurse 因其在细胞周期调控方面的杰出贡献, 2001 年获得了诺贝尔生理学或医学奖<sup>[2]</sup>, 他参与了裂殖酵母基因组测序的工作<sup>[3]</sup>。裂殖酵母的基因组含有 3 条染色体, 大约 5, 000 个基因, 其中 10% 是孤儿基因 (orphans), 有 50 个基因与人类疾病基因很相似, 其中约一半与癌症有关。此外, 科学家还发现了一组对真核细胞的结构组织及分裂很重要的基因, 这些基因可能是伴随最早的真核生物而出现的特有基因。对于裂殖酵母的研究将更有利于帮助人们了解高等真核生物。

### 1.1 裂殖酵母中调控细胞胞质分裂的信号途径 SIN

细胞核分裂与细胞胞质分裂的准确协调是确保染色体正确分离及基因组稳定的关键, 过早或过晚的细胞胞质分裂会造成核物质的不均等分配或子细胞中基因组的倍性异常。为了确保每个子细胞都包含一套完整的染色体, 胞质分裂必须发生在姊妹染色单体分离之后。因此, 需要一个机制来确保细胞核分裂与细胞质的准确协调, 以保证基因分配的稳定性。裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 中, 在细胞核分裂的后期结束之前有一个信号传导通路 SIN (septation initiation network) 参与启动细胞胞质分裂过程<sup>[4-8]</sup>。

#### 1.1.1 SIN 的蛋白组份及其功能

SIN 通路至少包括 10 种不同的蛋白<sup>[9,10]</sup>: Sid4, Cdc7, Cdc11, Cdc14, Cdc16, Byr4, Spg1, Sid1, Sid2 及 Mob1 (图 1.1)。所有这些蛋白都在整个细胞周期或只在细胞分裂的后期定位于纺锤体极体 (spindle pole body, 简称 SPB) 上<sup>[11]</sup>。其中, Sid4p 和 Cdc11p 可以形成复合体<sup>[14]</sup>, 人们普遍认为 Sid4p-Cdc11p 复合体的主要功能是作为支架 (scaffold)<sup>[11-13]</sup>, 使得 SIN 通路上的其它蛋白能够在需要的时



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库